บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง, สมุนไพร, เคมีภัณฑ์ และเครื่องมือ

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาว (rat) Wistar strain เพศผู้ น้ำหนัก 150 - 200 กรัม จากโครงการศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

หนูถีบจักร (mice) Albino strain เพศผู้ น้ำหนัก 20 - 21 กรัม จากโครงการศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

1.2 สมุนไพรและแหล่งที่มา

ผงใบแห้งของฟ้าทะลายโจร บดละเอียดผ่านแร่ง no. 80 ซึ่งเป็นงานวิจัย ของ ผศ. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารสกัดอย่างหยาบจากใบเปล้าน้อยด้วยแอลกอฮอล์และน้ำ จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในโครงการพัฒนากระบวนการผลิตยารักษาโรคกระเพาะอาหารจากพืชสมุนไพร

1.3 เคมีภัณฑ์และแหล่งที่มา

Pentobarbital sodium (Nembutal®) จาก Abbott Laboratories ; Ethanol จาก E. Merck ; Formalin solution จาก Formitalia Carlo Erba ; Acetic acid solution จาก Mallinckrodt Inc. ; Anesthetic ether จาก May and Baker LTD.; Cimetidine จาก Olic ; Acetylsalicylic acid (Aspirin®), atropine sulfate, sodium carboxymethylcellulose(high grade),sodium chloride จาก Sigma ; tragacanth จากบริษัท ที.เคมี

1.4 เครื่องมือ

Stress cages สำหรับ หนูถีบจักร มีรูปทรงเป็นทรงกระบอก ตั้ง

ตรง ปลายด้านบนบุด้วยสังกะสีมีช่องเปิดสำหรับให้หนูโผล่ศีรษะหายใจได้ ส่วนด้านล่างเป็นบานพับสังกะสีปิดเปิดได้ ผิวด้านข้างโดยรอบเป็นลวดตาข่าย เพื่อให้หนูยึดเกาะได้ ดังรูปที่ 5

Microscope ของบริษัท Meiji ซึ่งมีกำลังขยายสูงสุด เท่ากับ 80 เท่า

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมสารชนิดต่าง ๆ

ก. การเตรียมยาแขวนตะกอนของ aspirin

ชั่งผง aspirin 100 และ 200 มก. นำไปบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 0.25 % sodium carboxymethylcellulose จนได้ยาแขวนตะกอน ปรับปริมาตรจนครบ 5 มล. จะมีความเข้มข้นของ aspirin เท่ากับ 100 และ 200 มก./นน.ตัว 1 กก. หรือ 20 และ 40 มก./มล. ใส่ในขวดปิดฝาให้สนิท

ข. การเตรียมยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจร

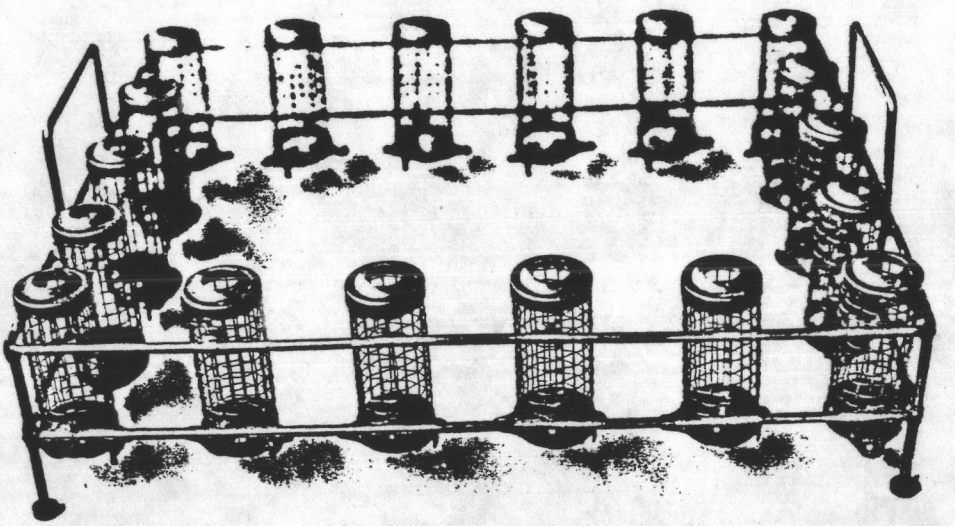
ชั่งผงใบฟ้าทะลายโจร 300 และ 600 มก. นำไปบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1 % tragacanth จนได้ยาแขวนตะกอนปรับปริมาตรจนครบ 20 มล. จะมีความเข้มข้นของยาเท่ากับ 75 และ 150 มก./นน.ตัว 1 กก. หรือ 15 และ 30 มก./มล. ใส่ในขวดปิดฝาให้สนิท

ค. การเตรียมยาแขวนตะกอนของสารสกัดอย่างหยาบจากใบเปล้าน้อยด้วยแอลกอฮอล์

สกัดผงใบเปล้าน้อยในแอลกอฮอล์ (ethanol) จากนั้นระเหยแอลกอฮอล์ออก จะได้สารสกัดอย่างหยาบจากใบเปล้าน้อยในลักษณะข้นเหนียวสีดำ ซึ่งจะมี plaunotol 5 - 6 % จากนั้นชั่งมา 0.68 และ 1.36 กรัม นำไปบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1 % tragacanth จนได้ยาแขวนตะกอนปรับปริมาตรจนครบ 5 มล. จะมีความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.38 และ 0.75 กรัม/นน.ตัว 1 กก. หรือ 76 และ 150 มก./มล. ใส่ในขวดปิดฝาให้สนิท

ง. การเตรียมสารสกัดจากใบเปล้าน้อยด้วยน้ำร้อน

ชั่งผงใบแห้งของเปล้าน้อย 10 กรัม ใส่ในภาชนะขนาดความจุ 1,000 มล. จากนั้นเทน้ำต้มเดือดที่มีอุณหภูมิประมาณ 95 °ซ. ในปริมาณ 1,000 มล. ให้ท่วมผงใบ ปิดฝาตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำไปกรองแยกส่วนน้ำใสออกมา นำไประเหยน้ำออกโดยใช้อุณหภูมิต่ำประมาณ 50° ซ จนได้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า



รูปที่ 5 แสดง stress cage

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จ. การเตรียมยาแขวนตะกอนของผงยา cimetidine

ชั่งผงยา cimetidine 480 มก. นำไปบดรวมทีละน้อยกับสารแขวนตะกอน 1 % tragacanth จนได้ยาแขวนตะกอน ปรับปริมาตรจนครบ 20 มล. จะมีความเข้มข้นของยาเท่ากับ 120 มก./นน.ตัว 1 กก. หรือ 24 มก./มล. ใส่ในขวดปิดฝาให้สนิท

2.2 ศึกษาผลของ stress ต่อการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูถีบจักรโดยวิธีการแช่หนูในน้ำ

จากการศึกษาของ Yano & Harada (1973) พบว่า อุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสมในการทำ stress อยู่ในช่วง 23 - 35 ^{0}ซ. ซึ่งไม่พบว่ามีหนูตายในระหว่างการทดลอง และอุณหภูมิของน้ำที่จะทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารสูงสุด คือ 25^{0}ซ. แผลจะเริ่มเกิดหลังจากหนูถูกแช่น้ำนานเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ลักษณะแผลที่เกิดจะตื้นและแคบ ขนาดแผลจะกว้างและลึกที่สุดเมื่อหนูถูกแช่น้ำนานเป็นเวลา 18 ชั่วโมง อัตราการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูถีบจักรเพศผู้และเพศเมียไม่แตกต่างกัน ในการศึกษาได้ดัดแปลงการทดลองโดยใช้หนูถีบจักรเพศผู้ซึ่งมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 20 - 25 กรัม ขังใน stress cages แล้วแช่ในแนวดิ่งลงในอ่างน้ำพร้อมเปิดเครื่องปรับอากาศตลอดการทดลอง ซึ่งจะทำให้อุณหภูมิของน้ำที่ใช้แช่หนูตลอดการทดลองจะเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 26 ± 3^{0}ซ. ระยะเวลาที่ใช้แช่หนูนาน 18 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่เวลา 15.00 น. ถึง 9.00 น. ในวันรุ่งขึ้น ระดับของน้ำที่แช่ให้อยู่ในระดับอกของหนู ให้ส่วนคอพ้นน้ำได้ ก่อนการทดลองไม่จำเป็นต้องให้หนูอดอาหารก่อนเพราะ Takagi & Okabe (1967) พบว่า การให้หนูอดอาหารก่อนการทดลองจะลด % incidence ในการเกิดแผล

เมื่อแช่หนูในน้ำครบ18ชั่วโมงแล้ว ฆ่าด้วยวิธีดึงกระดูกข้อต่อคอและไขสันหลังให้หลุดจากกัน แยกส่วนกระเพาะอาหารออกมาทันที ทำให้พอง (inflat) ด้วยการฉีด 3 % formalin solution 1 มล. แล้วแช่ใน 3 % formalin solution นาน10นาที เพื่อ fix ทั้งด้านในและด้านนอกกระเพาะอาหาร จากนั้นผ่าเปิดกระเพาะตาม greater curvature ล้างให้สะอาดด้วย 0.9 % NaCl นำไปส่องดูด้วยกล้อง วัดผลรวมขนาดความยาวของ haemorrhagic lesion ในหน่วย มม./หนู คำนวณค่า lesion index แบ่งการศึกษาย่อยออกเป็น

ก. ศึกษาการหายกลับคืนสภาพเดิม (recovery) ของ haemorrhagic lesion โดยแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 จำนวน 16 ตัว นำไปทำการ stress แล้ววัดค่า lesion index เมื่อทำการ stress ครบ 18 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 จำนวน 16 ตัว นำไปทำการ stress เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน ฆ่าแล้ววัดค่า lesion index

กลุ่มที่ 3 จำนวน 15 ตัว นำไปทำการ stress เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 5 วัน ฆ่าแล้ววัดค่า lesion index

ข. ศึกษาผลของการstressหนูซ้ำทุก2 วัน ต่อการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร โดยแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 จำนวน 16 ตัว นำไปทำการ stress แล้ววัดค่า lesion index เมื่อทำการ stress ครบ 18 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 จำนวน 15 ตัว นำไปทำการ stress เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน นำไปทำการ stress เป็นเวลา 18 ชั่วโมงซ้ำอีกครั้ง ฆ่าแล้ววัดค่า lesion index

กลุ่มที่ 3 จำนวน 15 ตัว นำไปทำการ stress เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน นำไปทำการ stress เป็นเวลา 18 ชั่วโมงซ้ำเป็นครั้งที่ 2 แล้วนำไปเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปทำการ stress เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซ้ำเป็นครั้งที่ 3 ฆ่าแล้ววัดค่า lesion index

กลุ่มที่ 4 จำนวน 14 ตัว นำไปทำการ stress เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน นำไปทำการ stress ซ้ำอีกครั้งจนครบ 18 ชั่วโมง แล้วเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 2 วัน ฆ่าแล้ววัดค่า lesion index

2.3 ศึกษาผลของ aspirin ต่อการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูขาว

จากการศึกษาของ Brodie (1967) ในหนูขาว Holtzman strain น้ำหนัก 125 - 175 กรัม ให้หนูอดอาหารก่อนการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ยาแขวนตะกอนของ aspirin ใน 1 % methylcellulose ทางปาก พบว่า ในเวลา 4 ชั่วโมงหลังจากการให้ยาแขวนตะกอนของ aspirin แก่หนูที่อดอาหารและน้ำจะพบ haemorrhagic lesion ในกระเพาะอาหารเกิดขึ้น และถือว่าให้ผลบวก เมื่อแผลใดแผลหนึ่งมีขนาดความยาวเท่ากับ 2 มม. หรือมากกว่า ความรุนแรงของแผลที่เกิดขึ้นกับวิธีการบริหารยาและขนาดยา โดยยาแขวนตะกอนของ aspirin ที่ให้ทางปากจะทำให้เกิดแผลได้มากกว่าการให้โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง ลักษณะการเกิดแผลจะเป็น dose response curve ในลักษณะเส้นตรง ขนาดของยาแขวนตะกอนของ aspirin น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดแผล คือ 64 มก./นน.ตัว 1 กก. และขนาดที่ทำให้

หนูทุกตัวเกิด positive haemorrhagic lesion (% incidence = 100 %) คือ 128 มก./นน.ตัว 1 กก.และ methylcellulose หรือ carboxymethylcellulose ที่ใช้แขวนตะกอนผงยาไม่มีฤทธิ์ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารแต่อย่างใด (Holsapple & Yim, 1981)

ในการศึกษาได้เลือกใช้หนูขาว Wistar strain ให้หนูอดอาหารก่อนการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วให้ยาแขวนตะกอนของ aspirin ใน 0.25 % sodium carboxymethylcellulose เข้าทางหลอดอาหาร ในขนาด 100 และ 200 มก./นน.ตัว 1 กก. ให้หนูอดอาหารและน้ำต่ออีกเป็นเวลา 7 ชั่วโมง จากนั้นฆ่าหนูด้วย ether แยกส่วนกระเพาะอาหารออกมาทันทีแช่ใน 3% formalin solution 10 นาที ผ่าเปิดกระเพาะอาหารตาม greater curvature ล้างให้สะอาดด้วย 0.9% NaCl นำไปส่องดูด้วยกล้อง วัดผลรวมขนาดความยาวของ haemorrhagic lesion ในหน่วย มม./หนู คำนวณค่า lesion index แบ่งการศึกษาย่อยออกเป็น

ก. ศึกษาผลของน้ำหนักหนูต่อการเกิดแผลในกระเพาะอาหารจากยาแขวนตะกอนของ asprin ในขนาด 100 มก./นน.ตัว 1 กก. โดยแบ่งหนูตามน้ำหนักออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ดังนี้ 100 - 120 กรัม, >120 - 160 กรัม, >160 - 200 กรัม, และ> 200 - 250 กรัม เปรียบเทียบค่า lesion index ของ haemorrhagic lesion ในหนูแต่ละกลุ่มน้ำหนัก

ข. ศึกษาการหายกลับคืนสภาพเดิมของ haemorrhagic lesion โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 จำนวน 10 ตัว วัดค่า lesion index หลังจากให้ยาแขวนตะกอนของ aspirin เข้าทางหลอดอาหารในขนาด 100 มก./นน.ตัว 1 กก. เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 จำนวน 9 ตัว เมื่อให้ยาแขวนตะกอนของ aspirin เข้าทางหลอดอาหารในขนาด 100 มก./นน.ตัว 1 กก. จนครบ 7 ชั่วโมง นำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน ฆ่าแล้ววัดค่า lesion index

กลุ่มที่ 3 จำนวน 10 ตัว เมื่อให้ยาแขวนตะกอนของ aspirin เข้าทางหลอดอาหารในขนาด 100 มก./นน.ตัว 1 กก. จนครบ 7 ชั่วโมง นำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 5 วัน ฆ่าแล้ววัดค่า lesion index

กลุ่มที่ 4 จำนวน 10 ตัว ทำการทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่เพิ่มขนาดยาแขวนตะกอนของ aspirin เป็น 200 มก./นน.ตัว 1 กก.

กลุ่มที่ 5 จำนวน 10 ตัว ทำการทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2 แต่เพิ่ม

ขนาดยาแขวนตะกอนของ aspirin เป็น 200 มก./นน.ตัว 1 กก.

ค. ศึกษาผลของการได้รับยาแขวนตะกอนของ aspirin ซ้ำหลาย ๆ ครั้งต่อการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูขาว โดยแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ให้หนูทุกตัวได้รับอาหารและน้ำตามปกติ ให้ยาแขวนตะกอนของ aspirin เข้าทางหลอดอาหารในขนาด 200 มก./นน.ตัว 1 กก. วันละครั้งในเวลา 13.00 น. ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 3, 4 และ 5 วัน ตามลำดับ

2.4 ศึกษาผลของ acetic acid ต่อการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูขาว

จากการศึกษาของ Takagi et al. (1969) ในหนูขาว Donryn strain น้ำหนัก 200 - 300 กรัม โดยการฉีด acetic acid ที่มีความเข้มข้น 1, 10 และ 30 % ในขนาด 0.05 มล./ตัว เข้าใน subserosal layer ในส่วน glandular part ของผนังกระเพาะอาหารด้าน anterior wall พบว่า acetic acid ในความเข้มข้น 30 % จะทำให้เกิดแผลหลังจากฉีด 5 วัน ในขนาดพื้นที่ใหญ่ประมาณ 8 x 9 มม. [84.5 ± 6.4 $(มม.)^2$] มีความลึก 2 - 4 มม. และยังคงพบแผลหลังจากฉีด 150 วัน ในขนาด 9.0 ± 2.3 $(มม.)^2$ ไม่พบอาการผิดปกติใด ๆ ในหนูที่ได้รับการฉีดกรด และอัตราการเพิ่มน้ำหนักใกล้เคียงกับหนูปกติที่ได้รับการฉีดน้ำแทน ในการศึกษาได้เลือกใช้หนูขาว Wistar strain น้ำหนัก 180 - 230 กรัม วิธีการศึกษาทำโดยให้หนูอดอาหาร แต่ให้น้ำตลอดเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนการทดลอง (16.00 น.- 10.00 น.) ทำให้หนูสลบด้วยการฉีด pentobarbital sodium ในขนาด 50 มก./นน.ตัว 1 กก./มล. จากนั้นผ่าตาม middle epigastric incision แล้วฉีด 30 % acetic acid ตัวละ 0.05 มล. เข้าในชั้น subserosal layer ใน glandular part ของผนังกระเพาะอาหารด้าน posterior wall ซึ่งสะดวกต่อการฉีดมากกว่า ระวังอย่าให้ถูกเส้นเลือดในขณะที่ฉีด ใช้นิ้วหัวแม่มือกดตรงจุดที่ฉีดให้แน่น และคงกดอยู่หลังจากดึงเข็มออกอย่างน้อย 30 วินาที เพื่อป้องกันการไหลออกของกรด บริเวณที่กรดเข้าไปจะมีการบวมขาวเกิดขึ้น จากนั้นเย็บแผลผ่าตัดให้สนิทเรียบร้อย ทายาแดงติดต่อกันทุกวันจนแผลที่เย็บเชื่อมสนิท หลังจากนั้นฆ่าหนูด้วย ether ในวันที่ 7, 12 และ 22 วัน หลังการผ่าตัด (กลุ่มละ 5 ตัว) วัดพื้นที่ของแผลที่เกิดในหน่วย $(มม.)^2$ เปรียบเทียบกันเพื่อศึกษาการหายกลับคืนสภาพเดิมของแผล

2.5 ศึกษาฤทธิ์ของผงใบฟ้าทะลายโจรและสารสกัดอย่างหยาบจากใบเปล้าน้อย โดยแบ่งการพิจารณาออกเป็น 2 แบบ คือ

1. Preventive test เพื่อดูผลการยับยั้ง (% inhibition) ต่อการเกิดแผลใน

กระเพาะอาหารจาก stress และ aspirin

2. Curative test เพื่อดูผลการรักษา (% curation) ต่อแผลที่เกิดจาก 30 % acetic acid

Preventive test

2.5.1 Stress - induced gastric lesion ในหนูถีบจักร

วิธีการศึกษาทำโดยแบ่งหนูออกเป็น 7 กลุ่ม ยาที่ใช้ทดสอบจะถูกให้เข้าทางหลอดอาหารหนูถีบจักร โดย feeding tube (gavage) ก่อนการ stress 30 นาที (Yano & Harada, 1973)

กลุ่มที่ 1 จำนวน 15 ตัว ให้สารแขวนตะกอน 1 % tragacanth เป็น vehicle control group

กลุ่มที่ 2 จำนวน 17 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรในขนาด 150 มก./นน.ตัว 1 กก.

กลุ่มที่ 3 จำนวน 17 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรในขนาด 300 มก./นน.ตัว 1 กก.

กลุ่มที่ 4 จำนวน 15 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรในขนาด 450 มก./นน.ตัว 1 กก.

กลุ่มที่ 5 จำนวน 13 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของสารสกัดอย่างหยาบจากใบเปล้าน้อยด้วยแอลกอฮอล์ในขนาด 1.36 กรัม/นน.ตัว 1 กก.

กลุ่มที่ 6 จำนวน 13 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของสารสกัดอย่างหยาบจากใบเปล้าน้อยด้วยแอลกอฮอล์ ในขนาด 2.72 กรัม/นน.ตัว 1 กก.

กลุ่มที่ 7 จำนวน 13 ตัว ได้รับ atropine sulfate solution โดยการฉีดเข้าช่องท้อง ในขนาด 10 มก./นน.ตัว 1 กก. ก่อนการ stress 30 นาที เป็น standard group

2.5.2 Aspirin - induced gastric lesion แบ่งออกเป็น

ก. วิธีการศึกษาทำโดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม ยาที่ใช้ทดสอบจะถูกให้เข้าทางหลอดอาหาร วันละ 2 ครั้ง เวลา 10.00 น. และ 16.00 น. ติดต่อกัน 2 วัน ก่อนให้หนูอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วให้ยาแขวนตะกอน aspirin 100 มก./นน.ตัว 1 กก. พร้อมทั้งให้หนูอดอาหารและน้ำต่ออีกเป็นเวลา 7 ชั่วโมง (Best et al., 1984)

กลุ่มที่ 1 จำนวน 10 ตัว ให้สารแขวนตะกอน 1 % tragacanth เป็น vehicle control group

กลุ่มที่ 2 จำนวน 10 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรในขนาด 75 มก./นน.ตัว 1 กก./ครั้ง

กลุ่มที่ 3 จำนวน 10 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรในขนาด 150 มก./นน.ตัว 1 กก./ครั้ง

กลุ่มที่ 4 จำนวน 10 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของสารสกัดอย่างหยาบจากใบเปล้าน้อยด้วยแอลกอฮอล์ในขนาด 0.68 กรัม/นน.ตัว 1 กก./ครั้ง

กลุ่มที่ 5 จำนวน 10 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของสารสกัดอย่างหยาบจากใบเปล้าน้อยด้วยแอลกอฮอล์ในขนาด 1.36 กรัม/นน.ตัว 1 กก./ครั้ง

ข. วิธีการศึกษาเช่นเดียวกับในข้อ ก. แต่เพิ่มขนาดของยาแขวนตะกอนของ aspirin เป็น 200 มก./นน.ตัว 1 กก. และทดสอบผลเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจร โดยแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 จำนวน 15 ตัว ให้สารแขวนตะกอน 1 % tragacanth เป็น vehicle control gruop

กลุ่มที่ 2 จำนวน 15 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรในขนาด 75 มก./นน.ตัว 1 กก./ครั้ง

กลุ่มที่ 3 จำนวน 15 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรในขนาด 150 มก./นน.ตัว 1 กก./ครั้ง

Curative test

2.5.3 วิธีการศึกษาทำโดยฉีด 30 % acetic acid ในขนาด 0.05 มล./ตัว เข้าใน subserosal layer ในส่วน glandular part ของผนังกระเพาะอาหารด้าน posterior wall เพื่อให้เกิดแผลขึ้นในกระเพาะอาหารของหนูขาว จากนั้นให้ยาที่ใช้ทดสอบเข้าทางหลอดอาหาร ในวันที่ 2 หลังจากฉีด 30 % acetic acid วันละ 2 ครั้ง ในเวลา 10.00 น. และ 16.00 น. ทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 10 วัน แบ่งหนูออกเป็น 7 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 จำนวน 10 ตัว ได้รับอาหารและน้ำเท่านั้น เป็น water control group

กลุ่มที่ 2 จำนวน 10 ตัว ให้สารแขวนตะกอน 1 % tragacanth เป็น vehicle control group

กลุ่มที่ 3 จำนวน 10 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรในขนาด

75 มก./นน.ตัว 1 กก./ครั้ง

กลุ่มที่ 4 จำนวน 10 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรในขนาด 150 มก./นน.ตัว 1 กก./ครั้ง

กลุ่มที่ 5 จำนวน 10 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของสารสกัดอย่างหยาบจากใบเปล้าน้อยด้วยแอลกอฮอล์ ในขนาด 1.36 กรัม/นน.ตัว 1 กก./ครั้ง

กลุ่มที่ 6 จำนวน 12 ตัว ให้สารสกัดอย่างหยาบจากใบเปล้าน้อย ด้วยน้ำร้อน ในขนาด 1 มล./นน.ตัว 100 กรัม/ครั้ง

กลุ่มที่ 7 จำนวน 10 ตัว ให้ยาแขวนตะกอนของ cimetidine ในขนาด 120 มก./นน.ตัว 1 กก./ครั้ง

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลจะแสดงผลในรูปของ mean และ standard error of mean (SE) เป็นค่า lesion index และ ulcer index ซึ่งคำนวณได้จาก

ก. lesion index = Σ ผลรวมของ haemorrhagic lesion (มม.) ของหนูแต่ละตัว/จำนวนหนูทั้งหมด กรณีของ stress และ aspirin - induced gastric lesion (Hagiwara & Watanabe, 1983)

ข. ulcer index = Σ $(\text{มม.})^2$ ของ ulcer area /จำนวนหนูทั้งหมด กรณีของ acetic acid - induced chronic gastric ulcer (Takagi et al., 1969)

ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control และกลุ่ม treatment โดยใช้สถิติ "Student's t test" เมื่อ p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การคำนวณหา % incidence

% incidence = % จำนวนหนูที่มี haemorrhagic lesion $\geq$ 2 มม. /จำนวนหนูทั้งหมด (Holsappple & Yim, 1981)

การคำนวณหา % inhibition และ % curation ได้จาก

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{lesion index}_{\text{control}} - \text{lesion index}_{\text{test}}}{\text{lesion index}_{\text{control}}} \times 100$$

$$\% \text{ curation} = \frac{\text{ulcer index}_{\text{control}} - \text{ulcer index}_{\text{test}}}{\text{ulcer index}_{\text{control}}} \times 100$$

(Takagi et al., 1968)